

06 DEC 2004

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 12 月 18 日 (18.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/103703 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/22, A61P 3/10, 13/12, 19/00, 19/10
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/07198
- (22) 国際出願日: 2003 年 6 月 6 日 (06.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2002-165544 2002 年 6 月 6 日 (06.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 本宮 善愼 (MOTOMIYA, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒634-0804 奈良県橿原市内膳町 4-5-16 Nara (JP). 森口 佳之 (MORIGUCHI, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒171-8545 東京都豊島区高田 3 丁目 4 1 番 8 号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 大川 広行 (OHKAWA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒171-8545 東京都豊島区高田 3 丁目 4 1 番 8 号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY FOR BONE METABOLIC DISEASES

(54) 発明の名称: 骨代謝疾患治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a remedy for bone metabolic diseases which contains EPO as the active ingredient and a method of treating patients with bone metabolic diseases. In addition to the reported effect of increasing erythrocytes, a preparation containing EPO as the active ingredient is a novel preventive/remedy exerting an effect of ameliorating lesions in bone and bone marrow on patients with bone diseases, in particular, bone diseases based on bone metabolic errors. The pathological conditions to be treated therewith include bone diseases accompanied by bone metabolic errors such as osteodystrophy associating with renal failure, marble bones, diabetic nephropathy and osteoporosis.

(57) 要約: EPO を有効成分として含有する骨代謝疾患治療剤又は骨代謝疾患患者の治療方法を提供する。EPO を有効成分とする製剤は、既報の EPO による赤血球増加作用とは別に、骨疾患、特に骨代謝異常に基づく骨疾患に対して、骨および骨髄の病変治療による改善作用をもたらす新規の予防・治療剤であり、その対象病態は、骨代謝異常を示す骨疾患であり、腎不全に伴う骨異常栄養症、大理石病、糖尿病性腎症、骨粗鬆症等である。

WO 03/103703 A1

## 明 細 書

## 骨代謝疾患治療剤

## 5 [技術分野]

本発明は、エリスロポエチン（EPO）を有効成分とした骨代謝疾患、特に骨代謝異常に基づく骨疾患に対する治療剤及び治療方法に関する。

## [背景技術]

- 10 近年、人口の高齢化や寿命の延長により、骨代謝疾患に関する医療はQOLや医療費の増大化の観点から大いに注目が集まっている。ここで言う骨代謝疾患とは、いわゆる退行性骨疾患のみならず、高齢化による骨疾患、現代の生活習慣とも深く関係する腎不全や糖尿病に合併する骨代謝疾患も含まれている。骨代謝疾患の範囲は広範であることから、本
- 15 疾患への対処を如何に進めていくかが大きな社会的課題となっている。このような社会的背景のもとに、骨代謝疾患に関する科学的知見は1980年代後半から急速に蓄積されてきた。

- 骨代謝疾患に対する治療は、治療技術や薬物の開発とあいまって集約的に実施されている。この結果、それぞれの薬物の持つ多面的特性
- 20 (Redundancy)が見出され、たとえば造血因子と骨代謝関連薬物は相互に作用機序または類似した作用を示し、両者の深い相関が示唆されつつある。骨代謝疾患を罹患したモデル動物を用いて、骨代謝疾患治療法を検討・確立することは、骨代謝疾患患者のQOLの改善につながる有用な情報を提供することを可能とする。

- 25 骨疾患の中でも、骨量低下を指標とする骨粗鬆症等の骨折の危険率が上がる骨疾患に関しては、非侵襲的かつ簡便という理由から、その疾患の予防と診断を目的とした骨塩量をパラメータとした診断機器（骨塩量測定装置）の開発と技術の向上には著しいものがあった。

一方、骨代謝疾患に関する診断については、1970年代に骨標識法を用

いた形態学的観察に基づく骨形態計測診断法が開発されたものの、利便性に難点があるため、臨床現場では骨塩量測定装置ほどは汎用されていない。

アデニン誘発腎障害モデルラット（アデニンモデル）は、慢性腎不全  
5 1),2),3) のモデル動物である。このモデルの腎不全と骨量低下の關係に着目し、モデルの大腿骨の骨密度（骨塩量）を骨塩量測定装置で測定した結果、骨塩量には減少傾向が観察され、この病態にEPOを投与すると、骨塩量に回復傾向が観察されたという報告がある 4)。

本発明者らは、以前よりこのアデニンモデルを腎不全とその合併症の  
10 観点から精査し、腎不全を来した病態では、ヒトでの腎不全合併症と同様の、二次性副甲状腺機能亢進症、異所性石灰化、また骨代謝疾患である腎性骨異栄養症といった合併症を呈する病態モデル動物であることを報告してきた 5),6)。

腎性骨異栄養症等の骨代謝疾患の本態を探るためには、骨代謝に関連  
15 する骨芽細胞や破骨細胞の骨組織における量的バランスと、時間的概念を加味した機能的かつ経時変化に基づく、病理組織学的手法による最終解析が必要不可欠である。骨塩量の測定による非侵襲的診断法のみでは骨代謝疾患の一部である骨粗鬆症等の疑いがわずかに判明するだけであり、骨代謝疾患の本態を解析し、類推することは不可能であった。

20

#### [発明の開示]

このように骨代謝疾患のみならず形態学的変化を伴う疾患であれば、他領域例えば癌などの場合も同様に、その病態の確定診断は、定量化に加え、組織診断の所見をも加味しなければならない。ここに病理組織学  
25 的診断が、最終診断とされる科学的根拠があり、本発明においてはこの手法を第一義と捉え、骨塩量の測定だけでは判定できなかった骨代謝疾患への予防・治療効果を、この手法を用いて確認しようとするものである。

本発明の目的は、腎不全患者の骨代謝異常の予防と治療に有効である

予防・治療薬を提供することにある。

本発明者らは、アデニンモデルを用いて、このモデルでの骨代謝疾患の本態を探るために、さらにEPOの骨代謝への影響を精査するために、骨代謝に関連する骨芽細胞や破骨細胞の骨組織における量的バランスと、  
5 機能的かつ経時変化に基づく最終解析が必要と考え、十分な病理組織学的検索を実施した。その結果、アデニンモデルへEPOの投与を行うことで、骨代謝異状、特に腎性骨異栄養症を改善する作用があることを見出し、本発明に到達した。

#### 10 [図面の簡単な説明]

図1は、アデニン腎炎ラット（溶媒投与群）の大腿骨骨幹端の組織標本を撮影した写真である（8倍、HE染色）。

図2は、上記図1と同様の組織標本を撮影した写真である。但し、倍率は80倍である。

15 図3は、アデニン腎炎ラット（EPO投与群）の大腿骨骨幹端の組織標本を撮影した写真である（8倍、HE染色）。

図4は、上記図3と同様の組織標本を撮影した写真である。但し、倍率は80倍である。

図5は、正常ラットの大腿骨骨幹端の組織標本を撮影した写真である  
20 （8倍、HE染色）。

図6は、正常ラット（EPO投与群）の大腿骨骨幹端の組織標本を撮影した写真である（8倍、HE染色）。

#### [発明を実施するための形態]

25 本発明は、従来の骨代謝疾患の非侵襲性診断技術、例えば、骨塩量の測定等、によっては不可能であった、アデニンモデルの骨病変に対するEPOの治療効果を病理組織学的所見として見出したものである。

アデニンモデルは、アデニンを含む餌を調整し、これを一定期間摂餌させることにより、不可逆的な腎障害を惹起し、慢性腎不全の病態を呈

するモデルである。アデニン摂餌開始4日目より、アデニンの代謝物である2, 8-ジヒドロキシアデニン (2,8-dihydroxyadenine) が析出・結晶化して沈着物となる。このために尿細管には閉塞が起こり、周囲の組織障害が惹起されて不可逆的な腎障害に至り、慢性腎不全が形成される段階では、貧血、腎性骨異栄養症、2次性副甲状腺機能亢進症、異所性石灰化等のヒトの慢性腎不全患者の合併症と類似の病態を呈する。

本発明のEPOの適応疾患としては、骨代謝異常を示す骨疾患であり、腎不全に伴う骨異栄養症、大理石病、糖尿病性腎症、骨粗鬆症等が挙げられる。

10 EPOは、アデニン誘発による腎性骨異栄養症の骨代謝異常の病理組織学的所見を正常化させた。以下に、骨および骨髄の病理組織学的所見を説明する。

後の実験例において述べるが、使用した全てのアデニンモデルについて、骨幹部皮質骨における腎性骨異栄養症が、軽度ないし重度に観察された。これら中等度以上の骨異栄養症の骨幹端においては、2つの異なる特徴的な病理組織学的所見が得られた。

まず、膝関節部の大腿骨骨幹端からより骨幹部により近い部分（海綿骨近位部）は、骨髄と境界を形成するように第一次海綿骨の残存ないしは類骨形成を伴う未熟な骨基質の増加が観られ、骨幹部骨髄との連続性を欠き骨髄組織に乏しく血管形成は稀である（図1）。これらの海綿骨では、骨芽細胞は見られるが、破骨細胞は殆ど観察されず骨吸収は停滞しその結果、骨代謝が遅延し軟骨基質を残存している（図2）。これらの海綿骨近位部の病変部と骨端軟骨の間（海綿骨遠位部）には、少数ながら破骨細胞、骨芽細胞、海綿骨周囲の線維芽細胞から成る骨異栄養症の典型的な海綿骨組織が長軸に対して横断的に帯状に観察される（図1）。

EPO投与によりこれら海綿骨近位部、遠位部ともにそれらの骨表面には破骨細胞による骨吸収腔や活性化骨芽細胞の増加が見られ、同時に骨髄腔には、赤血球を入れる血管形成が多く、多くの部位で観られた（図3）。この血管内の赤血球増加は、骨幹部皮質骨内や骨吸収腔の小血管におい

ても観られた。また海綿骨周囲には、線維芽細胞が残存するが、活性化した破骨細胞と骨芽細胞が観られ骨基質は非薄化して層状骨を形成し、成熟した海面骨として観察された（図4）。

アデニンモデルにおける骨および骨髓病変へのEPO投与による病理組織学的改善効果として以下の様に要約される。アデニンモデルでは、その腎病変はアデニン摂餌数日後より発症し血中リン値の上昇、活性化VDの低下、PTHの産生亢進等により骨代謝異状も早期に惹起される。これらの骨病変は、海綿骨において二分される。初期アデニンの摂餌期間である4週間の骨代謝異状は、海綿骨遠位部に観られ、骨吸収低下に基づくリモデリングの遅延を主体とする類骨組織の増加と骨基質の残存として観察される。さらにその後、正常食摂餌への代替後4週間における腎機能の一過性の正常化があり、その期間に骨代謝が行われる海綿骨近位部では、線維性骨炎を特徴とする病変が観察された。これら両海綿骨部に認められた経時的骨代謝異状の変化は、摂餌切り替えにより惹起された。EPOは後半の4週間投与され、骨髓では赤血球造血が亢進し多数の赤血球を入れ充血した静脈（類洞）が多数観察された。EPO投与により赤血球造血亢進のほか、VEGF産生刺激に基づく血管形成と骨幹部骨髓からの造血幹細胞生着と前破骨細胞の流入による骨吸収開始とその結果惹起される骨形成とが誘導されたものと考えられる。最終的にはEPO投与により、両海綿骨部に認められた経時的骨代謝異状の海綿骨は、成熟した層状骨を形成し骨髓組織の回復化傾向が同時に進行し、骨骨髓両組織の病変の治癒が病理組織学的に観察された。

正常ラット（図5）にEPOを投与しても顕著な形態学的変化は認められなかった（図6）。

本発明で使用する活性成分であるエリスロポエチン（EPO）は、例えば、ヒト再生不良性貧血患者の尿から抽出して得られた天然のヒトEPO（特公平1-38,800号公報）や、ヒトEPOのアミノ酸配列に対応するメッセンジャーRNA（mRNA）を採取し、そのmRNAを利用して組換えDNA体を作成し、次いで適当な宿主（例えば、大腸菌

の如き菌類や、酵母類や、植物の細胞株や、C O S細胞、チャイニーズ  
ハムスター卵巣細胞（C H O）、マウスC－1 2 7細胞等の動物の細胞株  
等）で生産させる遺伝子組換技術により製造されたもの〔例えば、特公  
平1－4 4，3 1 7号公報、K e n n e t h J a c o b s等，N a t  
5 u r e，3 1 3，8 0 6～8 1 0（1 9 8 5）〕等を挙げることができる。

また、本発明で利用できるE P Oは、上記由来のものの外に、それら  
の改変体であってもよい。E P O改変体としては、例えば、特開平3－  
1 5 1 3 9 9号公報に記載された改変体が挙げられる。上記E P O改変  
体としては、もとの糖蛋白質のペプチド鎖のA s nがG l nに変異し、  
10 結合するN結合型糖鎖の結合数に変異したものがある。また他に、アミ  
ノ酸変異としては、特開平2－5 9 5 9 9号公報、特開平3－7 2 8 5  
5号公報記載のものが挙げられる。即ち、E P Oの有するE P Oレセプ  
ターへの作用特性を失わない限り、アミノ酸の変異、欠失、付加は何個  
でもよい。

15 本発明のE P Oを有効成分とする製剤については、その投与方法や剤  
型に応じて必要により、懸濁化剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、  
保存剤、吸着防止剤等を添加することができる。ここで、懸濁化剤の例  
としては例えばメチルセルロース、ポリソルベート8 0、ヒドロキシエ  
チルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセル  
20 ロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等を  
挙げることができ、溶解補助剤としては例えばポリオキシエチレン硬化  
ヒマシ油、ポリソルベート8 0、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレ  
ンソルビタンモノラウレート、マグロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエ  
ステル等を挙げることができ、安定化剤としては例えばヒト血清アルブ  
25 ミン、デキストラン4 0、メチルセルロース、ゼラチン、亜硫酸ナトリ  
ウム、メタ亜硫酸ナトリウム等を挙げることができ、等張化剤としては  
例えばD－マンニトール、ソルビトール等を挙げることができ、また、  
保存剤としては例えばパラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸  
エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等を

5 挙げることができる。更に、吸着防止剤としては例えばヒト血清アルブミン、レシチン、デキストラン、エチレンオキサイド・プロピレンオキサイド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。

本発明のEPOを有効成分とし、安定化剤としてある種のアミノ酸を添加することにより、ヒト血清アルブミンや精製ゼラチンを含まない安定なEPO溶液製剤を使用することもできる。この安定なEPO溶液製剤は特開平10-182481号公報に記載されている。この公報の説明は本明細書の一部に含まれるものとする。

このEPO溶液製剤で安定化剤として添加するアミノ酸には、遊離のアミノ酸ならびにそのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩を含む。本発明の溶液製剤には、これらのアミノ酸の1種または2種以上を組み合わせる添加することができる。好ましいアミノ酸は、D-、L-およびDL-体のロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジンおよびリジンならびにその塩であり、より好ましいのはL-ロイシン、L-トリプトファン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-リジンならびにその塩である。特に好ましいのは、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-リジンならびにその塩である。最も好ましいのはL-ヒスチジンならびにその塩である。

この安定なEPO溶液製剤の製法等の詳細については上記公報に記載された通りである。

本発明の目的の予防、治療薬における、これらEPOの投与量については、対象となる疾患やその病状等を配慮して適宜決定できるものであるが、投与量については、通常成人1人当たり0.1~500 $\mu$ g、好ましくは5~100 $\mu$ gである。

以下に、実験例及び実施例により、本発明を更に詳細に説明する。ただし、本発明はこれら実施例、実験例によって限定されるものではない。



なお、実験例において、本発明の効果を確認している。

[実験例]

(実験動物)

雄性 Wistar Rat (日本チャールズリバー) を 5 週齢で導入し、2 週間の馴  
5 化の後、7 週齢にて実験に供した。

(投与薬剤および投与スケジュール)

(1) 投与薬剤

E P O : エポジン注 3000 (エポエチン  $\beta$ 、中外製薬(株))。製剤を  
vehicle にて 200 IU/mL に希釈した。

10 vehicle : 0.25%ゼラチン、1.25% D-マンニトール含有 1mM リン酸  
緩衝液 pH 7.4。

アデニン : ラット正常固形試料 (CE-2、日本クレア(株)) の組成に、  
アデニン(6-aminopurine)を重量比で 0.75%含む混餌固形  
飼料を調製 (日本クレア(株)) し、adenine 混餌試料とした。

15 (2) 投与群

投与群は、

adenine vehicle 投与群 (アデニン試料を摂餌させ、vehicle を投与)

adenine E P O 投与群 (アデニン試料を摂餌させ、E P O を投与)

C E - 2 群 (正常食を摂餌させ、投与は実施せず)

20 を設定した。

(3) 投与スケジュール

アデニン摂餌開始日を Day 0 とした。

アデニンは、adenine vehicle 投与群および adenine E P O 投与群に  
対し、実験開始から 4 週間、adenine 混餌試料を摂餌させて投与した。

25 実験開始 5 週目から 8 週目までの 4 週間は正常餌を摂餌させた。C E -  
2 群は、実験開始から終了時まで正常餌を摂餌させた。

E P O は、実験開始 5 週目から 8 週目の 4 週間、200 IU/kg を背部皮  
下(頸背部)に週 3 回投与した。Vehicle は、実験開始 5 週目から 8 週目の  
4 週間、背部皮下に週 3 回投与した。E P O または vehicle は、投与液量

をそれぞれ 1 mL/kg とした。

(臓器採取)

実験開始 8 週目に解剖を行い、腎臓、副甲状腺、大腿骨等を採取してホルマリン固定を行った。

5 (組織標本作製)

ホルマリン固定の後、大腿骨は脱灰操作を行った。腎臓、副甲状腺および脱灰後の大腿骨はパラフィン胞埋して、パラフィン切片を作製した。それぞれ切片はヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色して、病理組織学的検索を実施した。

10 (結果)

- Wistar 系ラットにアデニン混餌試料を 4 週間摂餌させ、その後正常食を 4 週間摂餌させた。この処置により腎臓は、尿細管腔の拡張、尿円柱、尿細管上皮の変性萎縮、巨細胞形成を伴う上皮の増殖、細胞浸潤を伴う間質の肥厚など多彩な病変が観察された。これらは、アデニン摂餌によって腎機能低下を来す病理組織学的所見であり、彌慢性に中等度ないし重度に認められた。副甲状腺は、観察したアデニンモデル全例に増殖性の腫大が観察され、腺細胞の分裂像も多くの個体に認められた。正常食摂餌動物には、この様な変化は見られなかった。また、この副甲状腺の増殖性腫大の所見には、EPO 投与による影響は見られなかった。
- 20 骨および骨髄に関しては、全例のアデニンモデルの骨幹部皮質骨において腎性骨異栄養症が、軽度ないし重度に観察された。これら中等度以上の骨異栄養症の骨幹端においては、2つの異なる特徴的な病理組織学的所見が得られた。

- まず、膝関節部の大腿骨骨幹端からより骨幹部により近い部分 (海綿骨近位部) は、骨髄と境界を形成するように第一次海綿骨の残存ないしは類骨形成を伴う未熟な骨基質の増加が観られ、骨幹部骨髄との連続性を欠き骨髄組織に乏しく血管形成は稀である (図 1)。これらの海綿骨では、骨芽細胞は見られるが、破骨細胞は殆ど観察されず骨吸収は停滞しその結果、骨代謝が遅延し軟骨基質を残存している (図 2)。これらの海綿

骨近位部の病変部と骨端軟骨の間（海綿骨遠位部）には、少数ながら破骨細胞、骨芽細胞、海綿骨周囲の線維芽細胞から成る骨異栄養症の典型的な海綿骨組織が長軸に対して横断的に帯状に観察される。

EPO投与によりこれら海綿骨近位部、遠位部ともにそれらの骨表面  
5 には破骨細胞による骨吸収腔や活性化骨芽細胞の増加が見られ、同時に  
骨髓腔には、赤血球を入れる血管形成が多くの部位で観られた（図3）。  
この血管内の赤血球増加は、骨幹部皮質骨内や骨吸収腔の小血管におい  
ても観られた。また海綿骨周囲には、線維芽細胞が残存するが、活性化  
した破骨細胞と骨芽細胞が観られ骨基質は非薄化して層状骨を形成し、  
10 成熟した海面骨として観察された（図4）。

アデニンモデルにおける骨および骨髓病変へのEPO投与による病理  
組織学的改善効果として以下の様に要約される。アデニンモデルでは、  
その腎病変はアデニン摂餌数日後より発症し血中リン値の上昇、活性化  
VDの低下、PTHの産生亢進等により骨代謝異状も早期に惹起される。  
15 これらの骨病変は、海綿骨において2分される。初期アデニンの摂餌期  
間である4週間の骨代謝異状は、海綿骨遠位部に観られ、骨吸収低下に  
基づくりモデリングの遅延を主体とする類骨組織の増加と骨基質の残存  
として観察される。さらにその後、正常食摂餌への代替後4週間におけ  
る腎機能の一過性の正常化があり、その期間に骨代謝が行われる海綿骨  
20 近位部では、線維性骨炎を特徴とする病変が観察された。これら両海綿  
骨部に認められた経時的骨代謝異状の変化は、摂餌切り替えにより惹起  
された。EPOは後半の4週間投与され、骨髓では赤血球造血が亢進し  
多数の赤血球を入れ充血した静脈（類洞）が多数観察された。EPO投  
与により赤血球増殖亢進のほか、VEGF産生刺激に基づく血管形成と  
25 骨幹部骨髓からの造血幹細胞生着と前破骨細胞の流入による骨吸収開始  
とその結果惹起される骨形成とが誘導されたものと考えられる。最終的  
にはEPO投与により、両海綿骨部に認められた経時的骨代謝異状の海  
綿骨は、成熟した層状骨を形成し骨髓組織の回復化傾向が同時に進行し、  
骨骨髓両組織の病変の治癒が病理組織学的に観察された。

正常ラット(図5)にEPOを投与しても顕著な形態学的変化は認められなかった(図6)。

以下に、製剤に関する実施例を示す。

[実施例1]

- |   |            |           |
|---|------------|-----------|
| 5 | エリスロポエチン   | 8 $\mu$ g |
|   | 注射用蒸留水にて全量 | 2 ml      |

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

[実施例2]

- |    |            |           |
|----|------------|-----------|
|    | エリスロポエチン   | 8 $\mu$ g |
| 10 | 注射用蒸留水にて全量 | 2 ml      |

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

[実施例3]

- |    |            |            |
|----|------------|------------|
|    | エリスロポエチン   | 16 $\mu$ g |
| 15 | 注射用蒸留水にて全量 | 2 ml       |

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

[実施例4]

- |  |            |            |
|--|------------|------------|
|  | エリスロポエチン   | 16 $\mu$ g |
|  | 注射用蒸留水にて全量 | 2 ml       |

- 20 上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

[実施例5]

- |    |            |           |
|----|------------|-----------|
|    | エリスロポエチン   | 8 $\mu$ g |
|    | ヒト血清アルブミン  | 5 mg      |
| 25 | 注射用蒸留水にて全量 | 2 ml      |

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

[実施例6]

- |  |           |           |
|--|-----------|-----------|
|  | エリスロポエチン  | 8 $\mu$ g |
|  | ヒト血清アルブミン | 5 mg      |

注射用蒸留水にて全量 2 m l

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

[実施例 7]

5 エリスロポエチン 1 6  $\mu$  g  
 ヒト血清アルブミン 5 m g  
 注射用蒸留水にて全量 2 m l

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

[実施例 8]

10 エリスロポエチン 1 6  $\mu$  g  
 ゼラチン 5 m g  
 注射用蒸留水にて全量 2 m l

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

15 [実施例 9 ~ 1 2]

実施例 5 ~ 8 におけるヒト血清アルブミンに代えて 5 m g のデキストラン 4 0 を用い、これら実施例 5 ~ 8 と同様にして注射剤を調製した。

[実施例 1 3]

20 注射用蒸留水 1 0 0 m l 中に D - マンニトール 5 g 、 エリスロポエチン 1 m g 、 ヒト血清アルブミン 1 0 0 m g を無菌的に溶解して水溶液を調製し、1 m l ずつバイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

[実施例 1 4]

調剤溶液 1 m l 中に以下の成分：

E P O 1 5 0 0 国際単位  
 25 非イオン性界面活性剤 0 . 0 5 m g  
 (ポリソルベート 8 0 : 日光ケミカル社製)  
 塩化ナトリウム 8 . 5 m g  
 L - アルギニン塩酸塩 ( S i g m a 社製 ) 1 0 m g

を含み、1 0 m M リン酸緩衝溶液 (和光純薬社製) にて p H 6 . 0 に調

整した溶液を、5 m l のガラスバイアルに 1 m l 充填し、打栓、密封し、溶液製剤に供した。

[実施例 1 5]

調剤溶液 1 m l 中に以下の成分：

- |   |                               |              |
|---|-------------------------------|--------------|
| 5 | E P O                         | 1 5 0 0 国際単位 |
|   | 非イオン性界面活性剤                    | 0 . 0 5 m g  |
|   | (ポリソルベート 8 0 : 日光ケミカル社製)      |              |
|   | 塩化ナトリウム                       | 8 . 5 m g    |
|   | L - ヒスチジン塩酸塩 ( S i g m a 社製 ) | 1 0 m g      |

- 10 上記実施例 1 4 と同様に溶液製剤を調製した。

[実施例 1 6]

調剤溶液 1 m l 中に以下の成分：

- |    |                             |              |
|----|-----------------------------|--------------|
|    | E P O                       | 1 5 0 0 国際単位 |
|    | 非イオン性界面活性剤                  | 0 . 0 5 m g  |
| 15 | (ポリソルベート 8 0 : 日光ケミカル社製)    |              |
|    | 塩化ナトリウム                     | 8 . 5 m g    |
|    | L - リジン塩酸塩 ( S i g m a 社製 ) | 1 0 m g      |

上記実施例 1 4 と同様に溶液製剤を調製した。

20 [産業上の利用可能性]

本発明の E P O 有効成分とする製剤は、既報の E P O による赤血球増加作用とは別に、骨疾患、特に骨代謝異常に基づく骨疾患に対して、骨および骨髄の病変治癒による改善作用をもたらす新規の予防・治療剤であり、その対象病態は、骨代謝異常を示す骨疾患であり、腎不全に伴う

- 25 骨異栄養症、大理石病、糖尿病性腎症、骨粗鬆症等である。

[参考文献]

- 1) 横澤隆子、大浦彦吉、中川眸、岡田敏夫。 アデニン長期投与による血清尿酸レベルの上昇と腎機能障害。 日本農芸化学会誌, 56: 655-663

(1982).

- 2) Koeda, T., Wakaki, K., Koizumi, F., Yokozawa, T., Oura, H.  
Early changes of proximal tubules in the kidney of  
adenine-ingesting rats, with special reference to biochemical and  
5 electron microscopic studies. (「アデニン摂取ラットの腎臓における尿  
細管の早期変化に関する、生化学的および電子顕微鏡的研究」) Jpn. J.  
Nephrol. (ザ・ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・ネフロロジー) ., 30:  
1-8 (1988).
- 3) Yokozawa, T., Zheng, P. D., Oura, H., Koizumi, F. Animal model  
10 of adenine-induced chronic renal failure in rats. (「ラットにおけるア  
デニン誘発慢性腎不全の動物モデル」) Nephron (ネフロン) , 44:  
230-234 (1986).
- 4) 丘田英人、金子佳照、古川佳要子、矢和多多姫子、本宮善恢. rHuEPO  
の bone mineral density (BMD)に及ぼす影響について. 第9回腎とエ  
15 リスロポエチン研究会 Proceedings: 37-41 (2001)
- 5) Ohkawa, H., Imazeki, I., Moriguchi, Y., Imai, N., Matsubara, S.,  
Saito, M. Rapidly progressive secondary hyperparathyroidism due  
to renal failure in rats induced by adenine diet. (「アデニン食により  
誘発されたラットの腎不全による急速進行性二次性副甲状腺機能亢進  
20 症」) J. Am. Soc. Nephrol. (ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ソ  
サエティ・オブ・ネフロロジー) , 12: 822A (2001).
- 6) Imazeki, I., Ohkawa, H., Moriguchi, Y., Imai, N., Matsubara, S.,  
Saito, M. Rapidly progressive renal failure model rat induced by  
adenine diet. (「アデニン食により誘発された急速進行性腎不全モデルラ  
25 ット」) J. Am. Soc. Nephrol. (ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・  
ソサエティ・オブ・ネフロロジー) , 12: 816A (2001).

## 請求の範囲

1. エリスロポエチン（EPO）を有効成分として含有する骨代謝疾患治療剤。
- 5 2. 前記骨代謝疾患が、腎不全に伴う骨異栄養症、大理石病、糖尿病性腎症又は骨粗鬆症である、請求項 1 記載の治療剤。
3. 骨代謝疾患患者にエリスロポエチンを投与することからなる骨代謝疾患の治療方法。
4. エリスロポエチンを通常成人 1 人当たり 0.1～500  $\mu$ g、好  
10 ましくは 5～100  $\mu$ g を投与する、請求項 2 に記載の治療方法。
5. 前記骨代謝疾患患者が、腎不全に伴う骨異栄養症、大理石病、糖尿病性腎症又は骨粗鬆症のいずれかの疾患の患者である、請求項 3 に記載の治療方法。
6. エリスロポエチン（EPO）を有効成分として配合する骨代謝疾  
15 患治療剤の製造方法。
7. 前記骨代謝疾患が、腎不全に伴う骨異栄養症、大理石病、糖尿病性腎症又は骨粗鬆症のいずれかの疾患、請求項 7 に記載の治療剤の製造方法。



図 1

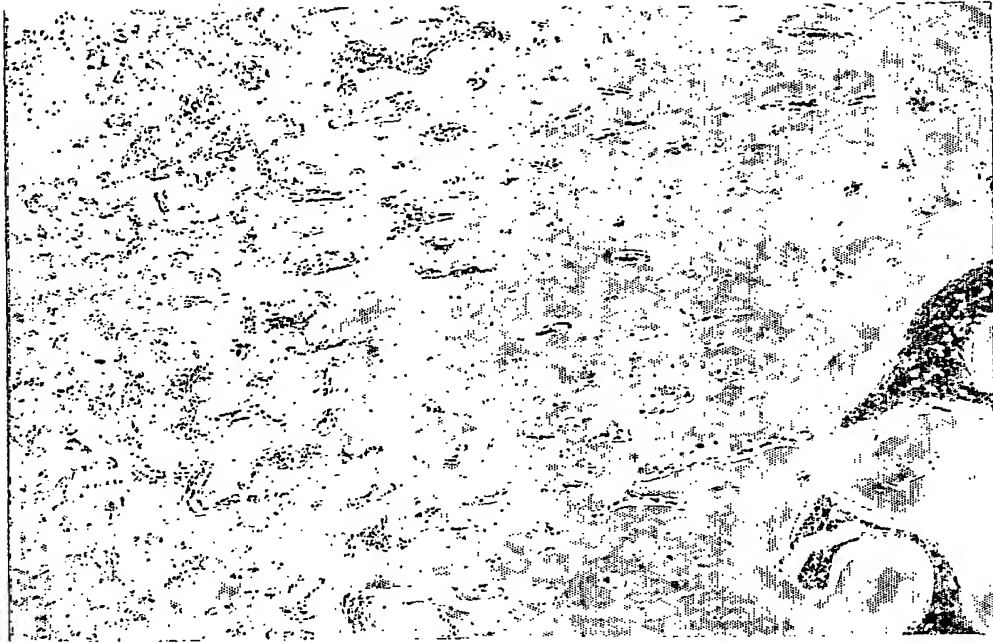


図 2



図 3

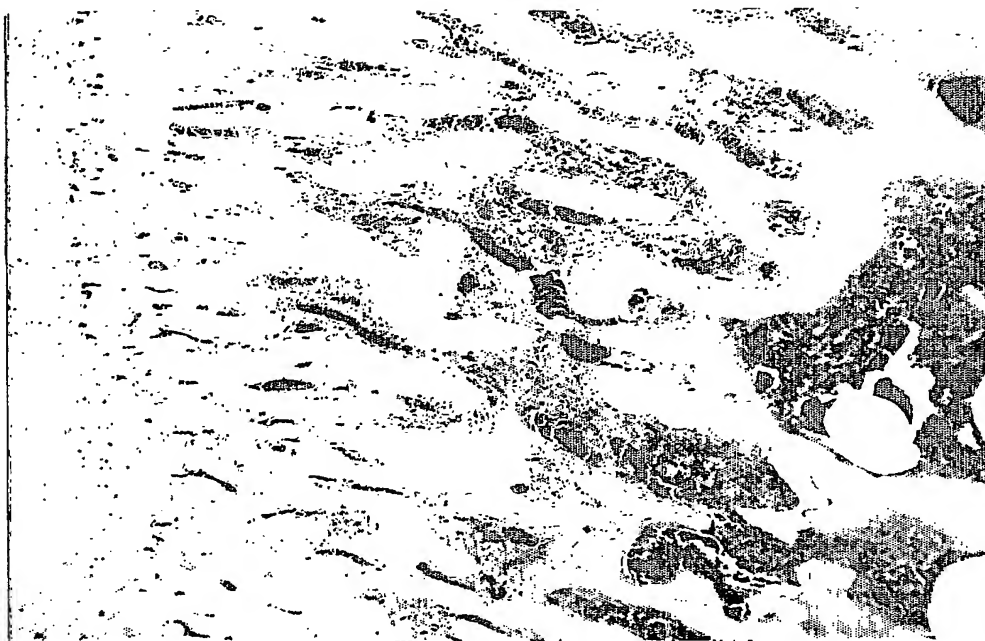


図 4



図 5

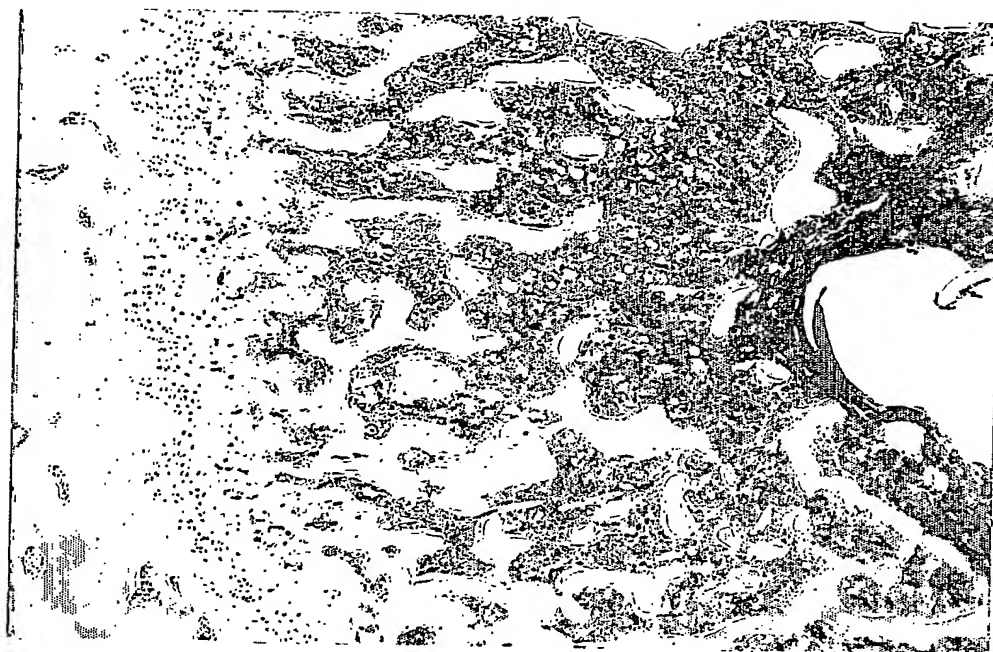
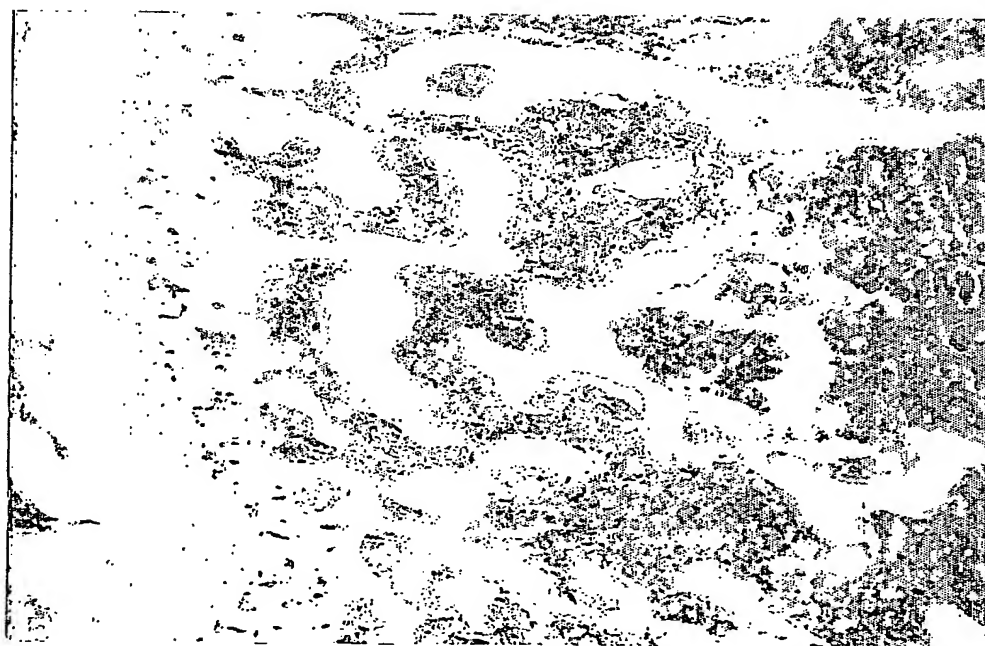


図 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07198

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/22, A61P3/10, 13/12, 19/00, 19/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00-58, A61P3/10, 13/12, 19/00, 19/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2003 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2003 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2003 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X         | MUNDY G.R. et al., Factors which stimulate bone growth in vivo, Growth Regulation, 1993, Vol.3, No.2, pages 124 to 128, full text; particularly, page 126, left column, lines 6 to 12          | 1, 2, 6, 7            |
| X         | EP 499242 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 19 August, 1992 (19.08.92), Full text; particularly, page 3, lines 42 to 44; Claim 1 & JP 5-132426 A  | 1, 2, 6, 7            |
| A         | SCHOBER, Hans-Christof et al, Bone histomorphometry in recombinant human erythropoietin-treated patients on chronic haemodialysis, Contributions to Nephrology, 1991, Vol.88, pages 127 to 135 | 1, 2, 6, 7            |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 September, 2003 (06.09.03)

Date of mailing of the international search report  
16 September, 2003 (16.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07198

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | JABS, Kathy, The effects of recombinant human erythropoietin on growth and nutritional status, Pediatric Nephrology, 1996, Vol.10, No.3, pages 324 to 327 | 1, 2, 6, 7            |
| A         | JP 62-31 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.),<br>06 January, 1987 (06.01.87),<br>Full text<br>(Family: none)  | 1, 2, 6, 7            |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07198

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3-5

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 3 to 5 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/22, A61P3/10, 13/12, 19/00, 19/10

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/00-58, A61P3/10, 13/12, 19/00, 19/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2003年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2003年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2003年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

|                |              |
|----------------|--------------|
| CAPLUS (STN)   | BIOSIS (STN) |
| REGISTRY (STN) | EMBASE (STN) |
| MEDLINE (STN)  |              |

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X               | MUNDY, G. R. <i>et al</i> , Factors which stimulate bone growth in vivo, Growth Regulation, 1993, Vol. 3, No. 2, pp124-128, 全文, 特に第126頁左欄第6-12行 | 1, 2, 6, 7       |
| X               | EP 499242 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 1992. 08. 19, 全文, 特に第3頁第42-44行, 請求項1 & JP 5-132426 A  | 1, 2, 6, 7       |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.08.03

国際調査報告の発送日

16.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浜田 麻子



4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                  |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | SCHÖBER, Hans-Christof <i>et al</i> , Bone histomorphometry in recombinant human erythropoietin-treated patients on chronic haemodialysis, Contributions to Nephrology, 1991, Vol.88, pp127-135 | 1, 2, 6, 7       |
| A                     | JABS, Kathy, The effects of recombinant human erythropoietin on growth and nutritional status, Pediatric Nephrology, 1996, Vol.10, No.3, pp324-327  | 1, 2, 6, 7       |
| A                     | JP 62-31 A(中外製薬株式会社)1987.01.06, 全文 (ファミリーなし)  | 1, 2, 6, 7       |



## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 3-5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲3-5は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。